

Capítulo 2

Clonagem, expressão de antígenos recombinantes do vírus da Doença de Aujeszky dos suínos: desenvolvimento e validação de teste de diagnóstico diferencial para monitoria em área livre

Janice Reis Ciacchi Zanella
Nelson Morés
Rejane Schaefer
Paulo Augusto Esteves
Liana Brentano

Introdução

O vírus da doença de Aujeszky (VDA) causa uma infecção em suínos de elevado impacto econômico para os mercados interno e externo. A doença ocorre em suínos no Brasil desde a década de 80, quando se tornou endêmica em estados produtores como Santa Catarina. O VDA é um vírus alfa herpesvírus envelopado com genoma DNA de fita dupla e linear. O genoma do VDA codifica 11 glicoproteínas, as quais são o maior alvo do sistema imune do hospedeiro em resposta à infecção. A glicoproteína E ou gE é uma proteína não essencial para replicação viral e a deleção do gene da gE é muito utilizada para a produção de vacinas com marcadores. Para o controle da DA é utilizada uma vacina deletada para a gE (glicoproteína E) viral. Assim, anticorpos de suínos vacinados podem ser detectados pelo teste de ELISA diferencial.

Um programa de erradicação iniciado em 2001, financiado por parceria da indústria, associação de produtores, governos e EMBRAPA, eliminou a DA de rebanhos suínos de SC. Todavia, para manter SC e o Brasil livres da DA, existe grande demanda para testes de diagnóstico baratos, seguros (sem partícula viral infecciosa) e de preferência, com tecnologia nacional. A efetivação do diagnóstico laboratorial dessa virose através da importação de reagentes é economicamente inviável e o desenvolvimento de insumos visa auxiliar programas de erradicação do VDA.

Objetivos

O objetivo final deste projeto foi viabilizar o desenvolvimento e validação de testes laboratoriais específicos e nacionais para auxiliar no prosseguimento do programa de erradicação e controle da Doença de Aujeszky em suínos no Estado de SC, visando sua aplicação em outros estados brasileiros. Desta forma, o projeto previu o desenvolvimento de insumos e testes de diagnóstico visando auxiliar nos programas de

erradicação do VDA. O insumo desenvolvido foi a proteína recombinante do VDA (gE) para desenvolvimento de teste de ELISA nacional de menor custo.

Resultados e discussão

Com o objetivo de clonar e expressar proteína viral do VDA, a sequência do gene da gE foi amplificada, e a gE clonada e expressada no sistema de expressão em baculovírus. A sequência completa do gene da gE do VDA foi amplificada por PCR, usando primers aneladores contendo os sítios para EcoRI e BamHI. O produto de 1771 pb da sequência completa da gE do VDA foi clonado no vetor pGem®-T Easy e subclonado no plasmídeo de expressão pFastBac™1. O DNA recombinante pFastBac-gE_VDA foi usado para a transposição sítio-específica no baculovírus recombinante (bacmid). Após seleção por antibióticos e cor, as colônias com o recombinante bacmid_pFastBac-gE_VDA foram selecionadas e a presença do gene da gE foi confirmada por PCR. O DNA recombinante viral, bacmid_pFastBac-gE_VDA, foi usado para cotransfecção de células de inseto *Trichoplusia ni* (Fig. 1) e, aos cinco dias pós-infecção, a presença do recombinante e a proteína gE foi determinada por PCR, por SDS-PAGE e Western blotting (Fig. 2), respectivamente.

Tecnologias geradas

O baculovírus_gE_VDA recombinante expressa uma proteína que poderá ser usada para produção de antígenos ou de anticorpos monoclonais no desenvolvimento de teste de diagnóstico mais sensível, seguro e específico para a DA.

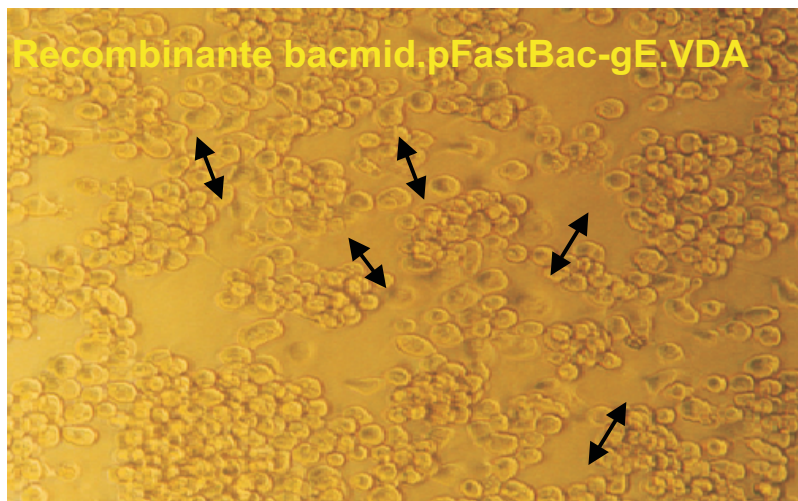


Fig. 1. Fotografia ao microscópio invertido de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com vírus recombinante bacmid-pFastBac.gE.VDA. Observa-se ECP no núcleo celular sem a formação de poliedros.

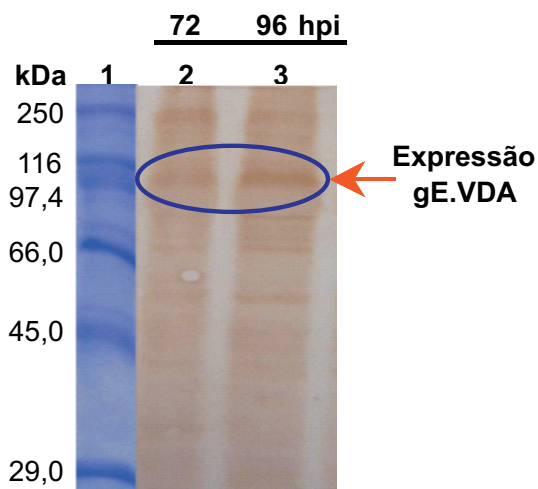


Fig. 2. Análise por "Western blotting" do extrato celular da produção de

Considerações finais

A tecnologia "Teste de Elisa Diferencial do Vírus da Doença Aujeszky" foi revisada e caracterizada para ser incluída junto à Embrapa Transferência de Tecnologia no Programa de Incubação de Empresas da Embrapa – PROETA. Mas, dentro das cinco tecnologias, foram selecionadas apenas três, sendo que o teste não foi contemplado. Em reunião de apresentação de resultados dos Núcleos Temáticos foi sugerido a inclusão dessa tecnologia para ser desenvolvida, patenteada, produzida e transferida para laboratórios de diagnóstico de instituições governamentais ou privadas, através de empresas de inovação interessadas.

Esse projeto gerou vários indicadores como seis artigos em revista indexada, seis trabalhos completo em anais de congresso; três resumos em congresso científico e 10 publicações técnicas, totalizando 25 publicações. Gerou também indicadores de divulgação do resultado de alcance individual (seis bolsas e/ou estágios), dois de alcance grupal (cursos e seminários) e 23 de alcance massivo, como a elaboração programa para o MAPA (Instrução Normativa N° 8 de 2007), três Congressos internacionais, quatro mesas redondas em congressos, duas entrevistas, três textos jornais/revistas e oito palestras. Esse projeto também teve duas premiações principais:

- Prêmio Nacional de Equipes Categoria Criatividade da Embrapa com o Projeto de Pesquisa: Clonagem, expressão de antígenos recombinantes do vírus da doença de Aujeszky dos suínos: desenvolvimento e validação de teste de diagnóstico diferencial para monitoria em área livre. Ano 2006.
- Melhor Trabalho Científico na Área de Sanidade (AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA E (GE) DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY PARA GERAÇÃO DE INSUMOS PARA PROGRAMA DE ERRADICAÇÃO), Congresso PorkWorld 2006.

Referências

DAMBROS, R.M.F.; RIBEIRO, B.M.; AGUIAR, R.W. de S.; SCHAEFER, R.; ESTEVES, A.; PERECMANIS, S.; SIMON, N.L.; SILVA, N.C.; COLDEBELLA, M.; ZANELLA, J.R.C. Cloning and expression of Aujeszky's disease virus glycoprotein E (gE) in baculovirus system. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p.494-499, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº8 DE 3 DE ABRIL DE 2007. NORMAS PARA O CONTROLE E A ERRADICAÇÃO DA DOENÇA DE AUJESZKY (DA) EM SUÍDEOS. Publicado no Diário Oficial da União de 10/04/2007, Seção 1, Página 1.